

PCT/JP2004/010928

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

09.8.2004

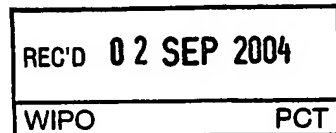
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2003年 8月 1日

出 願 番 号
Application Number: 特願2003-285007
[ST. 10/C]: [JP2003-285007]

出 願 人
Applicant(s): カルピス株式会社

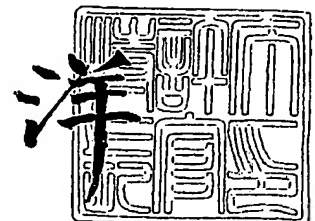


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 8月 2日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特2004-3068304

【書類名】 特許願
【整理番号】 P03-474
【提出日】 平成15年 8月 1日
【あて先】 特許庁長官 殿
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県相模原市淵野辺 5-11-10 カルピス株式会社基盤
 技術研究所内
 【氏名】 山本 直之
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県相模原市淵野辺 5-11-10 カルピス株式会社基盤
 技術研究所内
 【氏名】 水野 征一
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県相模原市淵野辺 5-11-10 カルピス株式会社基盤
 技術研究所内
 【氏名】 西村 新吾
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県相模原市淵野辺 5-11-10 カルピス株式会社基盤
 技術研究所内
 【氏名】 後藤 孝信
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県相模原市淵野辺 5-11-10 カルピス株式会社基盤
 技術研究所内
 【氏名】 松浦 啓一
【特許出願人】
 【識別番号】 000104353
 【氏名又は名称】 カルピス株式会社
【代理人】
 【識別番号】 100081514
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 酒井 一
【選任した代理人】
 【識別番号】 100082692
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 蔵合 正博
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 007010
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1
 【包括委任状番号】 0014648

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項1】**

獣乳カゼインを、アスペルギルス・オリゼー由来の酵素により分解してなる比活性2.0阻害%/μgペプチド/ml以上の分解物を含む、アンジオテンシン変換酵素阻害剤。

【請求項2】

前記分解物中のアミノ酸数3以下のペプチドの割合が90mol%以上100mol%以下であることを特徴とする請求項1記載のアンジオテンシン変換酵素阻害剤。

【請求項3】

前記分解物が、複数種類のアミノ酸及びペプチドの混合物であり、該混合物において、それぞれのペプチドのN末端から2残基目に存在するアミノ酸の全てのうちのプロリンの割合が25%以上であり、且つ/又はそれぞれのペプチドのN末端から3残基目に存在するアミノ酸の全てのうちのプロリンの割合が15%以上である、請求項1記載のアンジオテンシン変換酵素阻害剤。

【請求項4】

ペプチドIle-Pro、Glu-Pro、Arg-Pro、Gln-Pro、Met-Pro、Ser-Pro-Pro及びこれらの塩並びにこれらの混合物からなる群より選択されるペプチドを含む、請求項1記載のアンジオテンシン変換酵素阻害剤。

【請求項5】

獣乳カゼインを、アスペルギルス・オリゼー由来の酵素により分解する工程を含む、請求項1記載のアンジオテンシン変換酵素阻害剤の製造方法。

【請求項6】

前記アスペルギルス・オリゼー由来の酵素が、プロリンのN末端側以外のペプチド結合を特異的に切断する酵素である、請求項5記載の製造方法。

【請求項7】

前記アスペルギルス・オリゼー由来の酵素が、金属プロテアーゼ及びセリンプロテアーゼを含む、請求項5又は6記載の製造方法。

【請求項8】

獣乳カゼインを、アスペルギルス・オリゼー由来の酵素により分解してなるペプチド混合物であって、前記ペプチド混合物が、複数種類のアミノ酸及びペプチドの混合物であり、それぞれのペプチドのN末端から2残基目に存在するアミノ酸の全てのうちのプロリンの割合が25%以上であり、且つ/又はそれぞれのペプチドのN末端から3残基目に存在するアミノ酸の全てのうちのプロリンの割合が15%以上である、ペプチド混合物。

【請求項9】

ペプチドIle-Pro、Glu-Pro、Arg-Pro、Gln-Pro、Met-Pro、Ser-Pro-Pro及びこれらの塩並びにこれらの混合物からなる群より選択されるペプチドを含む、請求項8記載のペプチド混合物。

【請求項10】

獣乳カゼインを、アスペルギルス・オリゼー由来の酵素により分解する工程を含む、請求項8記載のペプチド混合物の製造方法。

【請求項11】

前記アスペルギルス・オリゼー由来の酵素が、プロリンのN末端側以外のペプチド結合を特異的に切断する酵素である、請求項10記載の製造方法。

【請求項12】

前記アスペルギルス・オリゼー由来の酵素が、金属プロテアーゼ及びセリンプロテアーゼを含む、請求項10又は11記載の製造方法。

【書類名】 明細書**【発明の名称】** アンジオテンシン変換酵素阻害剤、ペプチド混合物及びそれらの製造方法**【技術分野】****【0001】**

本発明は、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、ペプチド混合物及びそれらの製造方法に関する。

【背景技術】**【0002】**

アンジオテンシン変換酵素(ACE)は、生体内のアンジオテンシンIをアンジオテンシンIIに変換することにより、強い血圧上昇活性を呈する。したがって、そのようなACEの作用を阻害するACE阻害剤は、高血圧症等の疾患の予防、治療等に役立つことが期待される。

【0003】

現在、ACE阻害剤の一群として、いくつかのペプチドが知られている。このようなACE阻害ペプチドは、種々のタンパク質を、酵素により切断することにより産生することができると知られている(特許文献1参照)。ペプチドは、経口で腸管から吸収される場合、消化による影響を受けにくく吸収されやすい低分子量のものの場合特に、実際の使用における効果が高いことが期待される。

【0004】

しかしながら、タンパク質を酵素により切断してACE阻害ペプチドを得る場合、タンパク質分解物中に発生するペプチド全体における、ACE阻害活性を有するペプチドの割合がなかなか高くならず、結果として比活性の高いACE阻害剤を効率的に得ることが困難であるという問題がある。

【0005】

比活性の高いACE阻害剤を製造するためには、活性を有するペプチドを分離し精製することが考えられるが、その場合精製のための非効率的な工程を経なければならない。したがって、複雑な工程を経ずに、比活性の高いACE阻害剤を製造することが求められている。

。 **【特許文献1】 特開平6-128287号公報**

【発明の開示】**【発明が解決しようとする課題】****【0006】**

本発明の目的は、比活性が高く且つ効率的に得ることができるACE阻害剤を提供することにある。

【0007】

本発明の別の目的は、比活性の高いACE阻害剤を効率的に得ることができる製造方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】**【0008】**

本発明によれば、獣乳カゼインを、アスペルギルス・オリゼー由来の酵素により分解してなる比活性2.0阻害%/ μ gペプチド/ml以上の分解物を含む、アンジオテンシン変換酵素阻害剤が提供される。

【0009】

また、本発明によれば、獣乳カゼインを、アスペルギルス・オリゼー由来の酵素により分解する工程を含む、前記アンジオテンシン変換酵素阻害剤の製造方法が提供される。

【0010】

さらに、本発明によれば、獣乳カゼインを、アスペルギルス・オリゼー由来の酵素により分解してなるペプチド混合物であって、前記ペプチド混合物が、複数種類のアミノ酸及びペプチドの混合物であり、それぞれのペプチドのN末端から2残基目に存在するアミノ酸の全てのうちのプロリンの割合が25%以上であり、且つ/又はそれぞれのペプチドのN末端から3残基目に存在するアミノ酸の全てのうちのプロリンの割合が15%以上である、ペプチ

ド混合物が提供される。

【0011】

さらに、本発明によれば、獣乳カゼインを、アスペルギルス・オリゼー由来の酵素により分解する工程を含む、前記ペプチド混合物の製造方法が提供される。

【発明の効果】

【0012】

本発明のACE阻害剤は、比活性が高いものとしてことができ、且つ効率的に得ることができ、種々の医薬品、食品添加物、機能性食品等として有用である。

【0013】

本発明のACE阻害剤の製造方法では、比活性が高いACE阻害剤を効率的に製造することができ、種々の医薬品、食品添加物、機能性食品等の製造において有用である。

【0014】

本発明のペプチド混合物は、ACE阻害作用等の生理活性が高いものとしてことができ、且つ効率的に得ることができ、種々の医薬品、食品添加物、機能性食品等として有用である。

【0015】

本発明のペプチド混合物の製造方法では、ACE阻害作用等の生理活性が高いペプチド混合物を効率的に製造することができ、種々の医薬品、食品添加物、機能性食品等の製造において有用である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0016】

本発明のACE阻害剤は、獣乳カゼインを分解してなる分解物を含む。獣乳カゼインとしては、牛乳、馬乳、山羊乳、羊乳等のカゼインを用いることができるが、牛乳カゼインが好ましい。

【0017】

前記分解物は、前記獣乳カゼインをアスペルギルス・オリゼー(*Aspergillus oryzae*)由来の酵素により分解してなる。本発明において、アスペルギルス・オリゼー由来の酵素は、複数種類の酵素の混合物であってもよい。アスペルギルス・オリゼー由来の酵素としては、金属プロテアーゼ及び/又はセリンプロテアーゼを含むものを用いることができる。具体的には例えば、スミチームFP(商品名、新日本化学工業株式会社製)、ウマミザイム(商品名、天野エンザイム株式会社製)、Sternzym B11024(商品名、株式会社樋口商会製)、PROHIDROXY AMPL(商品名、株式会社樋口商会製)、オリエンターゼONS(商品名、阪急バイオインダストリー株式会社製)、デナチームAP(商品名、ナガセ生化学社製)、スミチームLP(商品名、新日本化学工業株式会社製)及びスミチームMP(商品名、新日本化学工業株式会社製)等を用いることができ、スミチームFPが特に好ましい。

【0018】

前記アスペルギルス・オリゼー由来の酵素は、プロリンのN末端側以外のペプチド結合を特異的に切断する酵素であることが好ましい。具体的には例えば、Xaa-Pro(Xaaはプロリン以外の任意のアミノ酸)の結合よりも、Pro-Xaaの結合のほうを高い頻度で切断することができ、且つXaa-Xaaの結合も切断できる酵素であることが好ましい。このような酵素により獣乳カゼインの分解を行なった場合、Xaa-Pro、Xaa-Pro-Proといった配列のペプチドが多く産生し、これらのうちにはACE阻害活性を有するものが多いため、好ましく本発明のACE阻害剤の製造を行なうことができる。

【0019】

獣乳カゼインを、アスペルギルス・オリゼー由来の酵素で分解する方法は、特に限定されないが、カゼインを含む獣乳、又は獣乳から取り出したカゼインを溶解した水溶液等の適当なカゼイン溶液に、酵素を、酵素/基質質量比=1/10~1/1000の割合で添加し、反応させることにより行なうことができる。反応温度及びpHは、酵素の至適温度及び至適pHとすることができるが、例えば温度は25~60℃、pHは3~10、好ましくは5~8の範囲内とすることができる。また、反応時間は、酵素の分解速度に応じて調整することができるが、

3～24時間反応を行なうことができる。

【0020】

前記反応終了後、酵素を失活させて反応を停止することが好ましい。酵素の失活は、例えば60～100℃に加熱することにより達成することができる。

【0021】

反応終了後の反応液は、そのまま、又は必要に応じて分解物を分離又は精製して、本発明のACE阻害剤とすることができる。分離又は精製は、例えばスプレードライ等により溶媒を除き粉末の分解物とすることなどにより行なうことができる。さらに、投与に際して、本発明のACE阻害剤を、投与に適した剤型とすることができる。具体的には錠剤、丸剤、顆粒剤、カプセル剤、散剤、水溶液、注射剤などの剤型とすることができ、そのために適宜賦形剤、希釈剤、その他の添加物等と混合する等して製剤化することができる。また、本発明のACE阻害剤は、食品添加物として菓子、飲料等の飲食品に添加するための食品添加物として用いることができる。またこれらの飲食品に本発明のACE阻害剤を配合し、機能性食品を構成することもできる。

【0022】

本発明のACE阻害剤は、2.0阻害%/μgペプチド/ml以上、好ましくは2.0～30阻害%/μgペプチド/mlの比活性を有する。ここでペプチドとは、2以上のアミノ酸がペプチド結合した重合物をいう。なお本願においては、特に断らないかぎり、ペプチドとは、1種類のペプチドのみならず2種類以上のペプチドの混合物をも含む。

【0023】

本願において比活性とは、分解物中のペプチド単位量当りの、当該ペプチドのACE阻害活性である。分解物中のペプチド量は、分解前のカゼイン量と分解物中のアミノ酸量との差から求めることができる。また、ペプチドのACE活性は、下記の通りに測定することができる：

ウシ肺由来のACEを0.1UとなるようにpH8.3、0.1Mホウ酸緩衝液に溶解し、ACE溶液を得る。ACE阻害能を有するペプチドを含む分解物の含有割合が50～1000μg/mlとなるように調整した試料水溶液を80μlとり試験管に入れ、200μlのヒプリルヒスチジルロイシン溶液(5mM、NaCl300mM含む)を添加し、さらに上記ACE溶液20μlを添加し、37℃で30分間反応させる。その後、1N塩酸250μlを添加して反応を停止させた後、1.7mlの酢酸エチルを加え、攪拌後、酢酸エチル層1.4mlを試験管に採取し、120℃で約60分間蒸発乾固させる。乾固物に1mlの蒸留水を加え、酢酸エチル中に抽出されたヒプリル酸の228nmでの吸光度を測定する。また対照として、試料水溶液添加しなかった他は上記と同様に操作したもの、ACE溶液を添加しなかった他は上記と同様に操作したもの、及び試料水溶液及びACE溶液を添加しなかった他は上記と同様に操作したものについて、吸光度を測定する。これらから、ACE阻害活性を、下記式(1)により求める。

式(1)：

$$\text{ACE阻害活性(\%)} = [(A-B)/A] \times 100$$

A: (試料水溶液を添加せずACE溶液を添加したものにおける吸光度) - (試料水溶液及びACE溶液を添加しなかったものにおける吸光度)

B: (試料水溶液及びACE溶液を添加したものにおける吸光度) - (試料水溶液を添加しACE溶液を添加しなかったものにおける吸光度)

【0024】

本発明のACE阻害剤においては、前記分解物中のアミノ酸数3以下のペプチドの割合が90mol%以上であることが好ましい。アミノ酸数3以下のペプチドの割合の上限は、特に限定されず100mol%以下とすることができる。このように低重合度のペプチドが活性物質として多く含まれることにより、吸収性に優れ、in vivoの活性が高いACE阻害剤となることが期待される。

【0025】

本発明のACE阻害剤は、含有する前記分解物が、複数種類のアミノ酸及びペプチドの混合物であり、該混合物において、それぞれのペプチドのN末端から2残基目に存在するアミ

ノ酸の全てのうちのプロリンの割合が25%以上であり、且つ/又はそれぞれのペプチドのN末端から3残基目に存在するアミノ酸の全てのうちのプロリンの割合が15%以上であることが好ましい。また、本発明のACE阻害剤は、ACE阻害活性の高い、ペプチドIle-Pro、Glu-Pro、Arg-Pro、Gln-Pro、Met-Pro、Ser-Pro-Pro、Ile-Pro-Pro、Val-Pro-Pro及びこれらの塩並びにこれらの混合物からなる群より選択されるペプチドを含むことが好ましい。

【0026】

本発明のACE阻害剤の投与対象は、ヒト及びヒト以外の哺乳類等の動物とすることができ、本発明のACE阻害剤の適用疾患としては、ACEの阻害により緩和される種々の疾患を挙げることができるが、高血圧症に対して適用することが特に好ましい。投与方法は、特に限定されないが経口投与が好ましい。投与量は、例えばヒトへの経口投与の場合、5~5000mg/日、好ましくは50~5000mg/日とすることができる。

【実施例】

【0027】

以下、本発明を実施例および比較例によりさらに具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらに限定されない。

【0028】

実施例1及び比較例1-1~1-8

(a) カゼイン(牛乳由来、日本NZMP社製)1gを、約80℃に調整した蒸留水99gに加え十分攪拌し、その後1N水酸化ナトリウム(和光純薬株式会社製)溶液を添加しpH7.0とし、また温度を20℃に調整し、基質溶液を調製した。

【0029】

(b) (a)で得た基質溶液に、表1に示す各種の酵素を、酵素/カゼインの質量比が1/25となるよう添加し、50℃で14時間反応させ、次いで110℃で10分間オートクレーブを行ない酵素を失活させ、酵素分解物溶液を得た。

【0030】

(c) 一方、ウシ肺由来のACE(和光純薬株式会社製)を0.1UとなるようにpH8.3、0.1Mホウ酸緩衝液に溶解し、ACE溶液を得た。(b)で得たそれぞれの酵素分解物溶液を、蒸留水で50倍に希釈した希釈酵素分解物溶液を80μlとり試験管に入れ、200μlのヒプリルヒスチジルロイシン溶液(5mM、NaCl300mM含む、シグマ社製)を添加し、さらに上記ACE溶液20μlを添加し、37℃で30分間反応させた。その後、1N塩酸(和光純薬株式会社製)250μlを添加して反応を停止させた後、1.7mlの酢酸エチル(和光純薬株式会社製)を加え、攪拌後、酢酸エチル層1.4mlを試験管に採取し、120℃で約60分間蒸発乾固させた。乾固物に1mlの蒸留水を加え、酢酸エチル中に抽出されたヒプリル酸の228nmでの吸光度を測定した。

【0031】

(d) 対照として、(d-1)希釈酵素分解物溶液を添加しなかった他は(c)と同様に操作したもの、(d-2)ACE溶液を添加しなかった他は(c)と同様に操作したものと及び(d-3)希釈酵素分解物溶液及びACE溶液を添加しなかった他は(c)と同様に操作したものについて、吸光度を測定した。

【0032】

(e) (c)及び(d)で測定した吸光度から、ACE阻害活性を、下記式(1)により求めた。結果を表2に示す。なお、本実施例の測定において、Aの値は0.35であった。

$$\text{ACE阻害活性(\%)} = [(A-B)/A] \times 100 \quad (1)$$

A: ((d-1)における吸光度) - ((d-3)における吸光度)

B: ((c)における吸光度) - ((d-2)における吸光度)

【0033】

(f) (c)における希釈酵素分解物溶液中のアミノ酸濃度を測定し(株式会社東レリサーチセンターによる)、その値から、(c)の反応系におけるペプチド含量を下記式(2)により求めた。また、ここで求めたペプチド量及び(e)で求めたACE阻害活性から、ペプチドあたりの比活性を下記式(3)により求めた。結果を表2に示す。

式(2):

$$(\text{ペプチド量}(\text{mg/ml})) = (\text{もとのタンパク質量}(\text{mg/ml})) - (\text{アミノ酸量}(\text{mg/ml})) \times 80/300 \\ = (0.2\text{mg/ml} - (\text{アミノ酸量}(\text{mg/ml})) \times 80/300$$

式(3):

$$(\text{比活性}(\text{阻害\%}/\mu\text{g/ml})) = (\text{ACE阻害活性}(\%))/[\text{ペプチド量}(\text{mg/ml}) \times 1000]$$

【0034】

【表1】

	プロテアーゼ起源	市販酵素名	販売会社名
実施例1	<i>Aspergillus oryzae</i>	スミチームFP	新日本化学工業
比較例1-1	豚の脾臓	トリプシン	樋口商金
比較例1-2	<i>Bacillus subtilis</i>	スミチームCP	新日本化学工業
比較例1-3	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	プロテアーゼS	天野エンザイム
比較例1-4	<i>Carica papaya</i>	精製パパイン	ナガセ生化学工業
比較例1-5	<i>Bacillus thermoproteolyticus</i>	サモアーゼ	大和化成
比較例1-6	<i>Rhizopus niveus</i>	ニューラーゼF3G	ノボザイムス ジャパン
比較例1-7	<i>Rhizopus delemar</i>	スミチームRP	新日本化学工業
比較例1-8	Pineapple cannery	ブロメラインF	天野エンザイム

【0035】

【表2】

	酵素名	ACE阻害活性 (%)	ペプチド量 ($\mu\text{g/ml}$)	比活性 (阻害 $\%/\mu\text{g/ml}$)
実施例1	スミチームFP	54.8	13.3	4.1
比較例1-1	トリプシン	41.8	51.2	0.8
比較例1-2	スミチームCP	59.0	51.2	1.2
比較例1-3	プロテアーゼS	69.3	51.2	1.4
比較例1-4	精製パパイン	52.9	52.8	1.0
比較例1-5	サモアーゼ	58.1	51.7	1.1
比較例1-6	ニューラーゼF3G	43.6	50.7	0.9
比較例1-7	スミチームRP	32.1	48.0	0.7
比較例1-8	ブロメラインF	54.6	51.2	1.1

【0036】

実施例2

(a) カゼイン(日本NZMP社製)15gを、約80℃に調整した蒸留水85gに加え十分攪拌し、その後1N水酸化ナトリウム溶液を添加しpH7.0とし、また温度を20℃に調整し、基質溶液を調製した。

【0037】

(b) (a)で得た基質溶液に、アスペルギルス・オリゼー由来の酵素(スミチームFP)を、酵素/カゼインの質量比が1/25となるよう添加し、50℃で14時間反応させ、次いで110℃で10分間オートクレーブを行ない酵素を失活させ、酵素分解物溶液を得た。これをスプレードライヤーにより乾燥させ、ペプチド混合物の粉末を得た。

【0038】

(c) (b)で得た粉末を適量の蒸留水に溶解し、ペプチドの配列を、自動ペプチド分析機(P SQ-10、株式会社島津製作所製)を用いて解析し、当該ペプチド混合物において、N末端側から順に、どのアミノ酸が位置するかを調べた。結果を表3に示す。

【0039】

【表3】

	(pmol)			
	1残基	2残基	3残基	4残基
Asp	82	304	115	63
Glu	139	127	89	121
Asn	55	49	46	91
Gln	80	97	104	80
Ser	105	36	27	16
Thr	31	16	25	18
His	28	94	58	0
Gly	256	38	33	16
Ala	323	101	58	30
Tyr	725	114	52	28
Arg	13	7	6	8
Met	182	43	36	10
Val	869	127	196	64
Pro	42	1371	431	186
Trp	94	46	26	6
Phe	800	88	60	28
Lys	81	33	57	19
Ile	350	37	17	10
Leu	400	39	50	10
合計	4317	2767	1447	387

【0040】

また、5残基目アミノ酸の合計は120pmol、6残基目アミノ酸の合計は100pmolであった。これらのことより、当該ペプチド混合物中のペプチドは殆どがアミノ酸残基数2～3のペプチドであることが分かった。また、2残基目及び3残基目のアミノ酸におけるProの割合が多いことから、当該ペプチド混合物はXaa-Pro-Pro又はXaa-Pro-Proの配列を多く含むことが分かった。

【0041】

実施例3

カゼイン中に存在しうる配列-Xaa-Pro-又はXaa-Pro-Pro-と同一の配列を有するペプチドXaa-Pro、Xaa-Pro-Proのうち、表4に示す配列を有する各種のペプチドを化学的に合成した(株式会社 東レリサーチセンター製、純度95%以上)。このペプチドを種々の濃度に溶解したのについて、実施例1(c)～(e)と同様の操作によりACE阻害活性を測定した。そして、ACE阻害率が50%になるペプチド濃度(μ M)を求め、IC50値とした。結果を表4に示す。

【0042】

実施例4

実施例2(a)(b)と同様に操作し、ペプチド混合物の粉末を得た。これを、10mg/mlとなるように蒸留水に溶解した。一方、表4に示す配列を有する各種の化学合成標準ペプチドの25、50及び100 μ g/ml溶液を作成し、これらを下記測定条件によるLC/MSにより分析した。ペプチド混合物の分析におけるピークのうち、標準ペプチドのものと分子量及びリテンションタイムが一致するものを、標準ペプチドと同一の配列として同定した。標準ペプチドのピークと対比することにより、溶解物中に、表4に示す各種のペプチドが含まれる割合を求めた。結果を表4に示す。

【0043】

(使用機器)

高速液体クロマトグラフ質量分析計: LCMS-2010(株式会社島津製作所製)

システムコントローラー: SCL-10Advp(株式会社島津製作所製)

オートインジェクター: SIL-10Advp(株式会社島津製作所製)
 送液ポンプ: LC-10Advp×2(株式会社島津製作所製)
 カラムオープン: CTO-10Avp(株式会社島津製作所製)
 フォトダイオードアレイ検出器: SPD-M10AVP(株式会社島津製作所製)
 オンラインデガッサ: DGU-14A(株式会社島津製作所製)
 カラム: Develosil C30-UG-3 (2.0mmI.D.×150mmL)(野村化学株式会社製)

【0044】

(測定条件)

移動相A: 0.1質量%ギ酸水溶液

移動相B: 100%アセトニトリル溶液

タイムプログラム: 0%B(0分)-7.5%B(30分)-80%B(30.01分)-100%B(35分)-0%B(35.1分)-STO P(45分)

試料注入量: 5 μ l

カラム温度: 50℃

検出波長: 200~300nm

イオン化モード: ESI(+)

霧化ガス流量: 4.5L/分

印加電圧: +4.5Kv

CDL温度: 250℃

ブロックヒーター温度: 200℃

CDL電圧: 0.0V

Q-array電圧: SCAN

分析モード: SIM測定

分析範囲: EP(m/z=245.2)、IP(m/z=229.3)、MP(m/z=247.3)、QP(m/z=244.2)、RP(m/z=272.3)、SPP(m/z=300.3)、VPP(m/z=312.1)、IPP(m/z=326.1)

取り込み時間: 0.5秒/Ch

【0045】

【表4】

ペプチド配列	IC50値(μ M)	ペプチド粉末10 mg/ml中の存在濃度(μ g/ml)
IP	443.9	28.0
EP	174.7	28.0
RP	275.2	37.2
QP	65.8	31.3
MP	135.3	79.5
SPP	44.5	5.3
VPP	3.0	30.1
IPP	1.6	32.0

【0046】

実施例5

実施例2(a)(b)と同様に操作し、ペプチド混合物の粉末を得た。これを生理食塩水に溶解し、自然発症高血圧ラット(SHR、雄、27週齢)に、用量0、9.6、32又は96mg/kg体重で経口投与した。投与前と投与5時間後の血圧を測定した。血圧測定前にはpreheat box(CSI JAPAN)でラットを45℃で8分間加温した。また、血圧測定はtail-cuff PB-98(Softron社製)を用い、無麻酔下tail-cuff法による尾動脈圧の測定により行なった。投与前と投与5時間後の収縮期血圧(SBP)の差を求めた。結果を図1に示す。図1中、***は $p<0.001$ 、**は $p<0.01$ であることをそれぞれ示す。図1に示される通り、9.6mg/kg体重以上の経口投与により、強い血圧降下作用が確認された。

【0047】

比較例4-1及び4-2

カゼインをスミチームFPにて分解する反応(実施例2(b))において、反応系に、EDTA(比較例4-1)又はフェニルメチルスルホニル フルオリド(PMSF; 比較例4-2)を濃度1mMとなる割合で添加した他は、実施例4と同様に操作し、LC/MSのクロマトグラムを得た。このクロマトグラム中のそれぞれのペプチドに由来するピークの高さを、実施例4の対応するピークと対比し、下記式(5)に基づいてEDTAおよびPMSFによる阻害率を求めた。結果を表5に示す。

式(5):

阻害率(%)=(比較例4-1又は4-2におけるピーク高さ/実施例4におけるピーク高さ)×100

【0048】

【表5】

ペプチド配列	比較例4-1 EDTAによる 阻害率(%)	比較例4-2 PMSFによる 阻害率(%)
IP	60.9	30.6
EP	100.0	23.0
RP	69.4	78.8
QP	88.5	52.3
MP	93.6	40.0
SPP	100.0	25.0
VPP	97.2	55.6
IPP	94.5	41.5

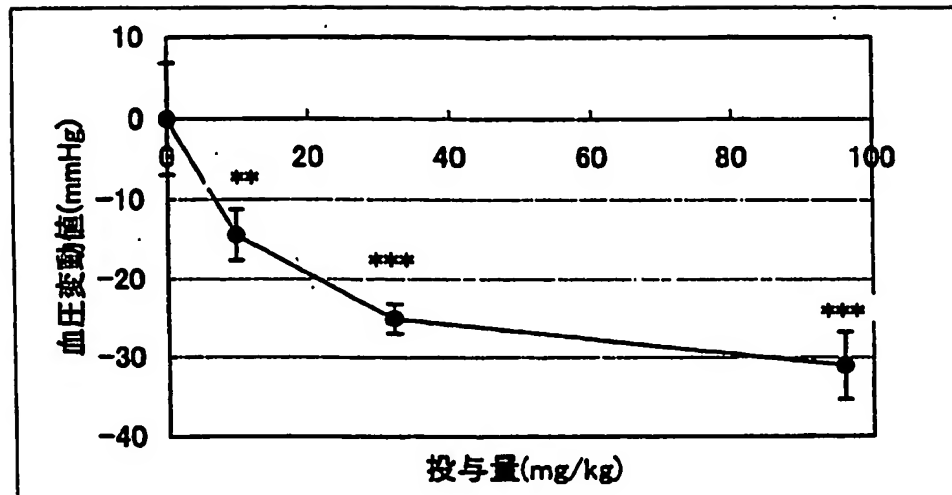
【図面の簡単な説明】

【0049】

【図1】 実施例4における、本発明のACE阻害剤の用量依存的な血圧降下作用の実験結果を示すグラフである。

【書類名】 図面

【図 1】



mg/kg	酵素分解物	標準誤差
96	-31	4.3
32	-25	1.9
9.6	-14.4	3.2
0	0	6.9

【書類名】要約書**【要約】**

【課題】比活性が高く且つ効率的に得ることができるACE阻害剤及びその製造方法を提供する。

【解決手段】獣乳カゼインを、アスペルギルス・オリゼー由来の酵素により分解してなる比活性2.0阻害%/ μ gペプチド/ml以上の分解物を含む、アンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害剤；獣乳カゼインを、アスペルギルス・オリゼー由来の酵素により分解してなるペプチド混合物であって、前記ペプチド混合物が、複数種類のアミノ酸及びペプチドの混合物であり、それぞれのペプチドのN末端から2残基目に存在するアミノ酸の全てのうちのプロリンの割合が25%以上であり、且つ/又はそれぞれのペプチドのN末端から3残基目に存在するアミノ酸の全てのうちのプロリンの割合が15%以上である、ペプチド混合物；並びにそれらの製造方法。

【選択図】 なし

特願 2003-285007

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000104353]

1. 変更年月日

1997年 9月 1日

[変更理由]

名称変更

住 所

東京都渋谷区恵比寿西2丁目20番3号

氏 名

カルピス株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects/in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.